Untersuchungen zur Beeinflussung der Glucoseoxydation durch Biguanide am Fettgewebe von diabetischen und nicht-diabetischen Menschen

Rudolf Weigl

1962

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546810_0075

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. W. Seitz

Untersuchungen zur Beeinflussung der Glucoseoxydation durch Biguanide am Fettgewebe von diabetischen und nicht-diabetischen Menschen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Rudolf Weigl
aus München

München 1962

A. Schubert, München 5, Corneliusstraße 21 · Telefon 221777

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent: Prof. Dr. W. SEITZ
Dekan: Prof. Dr. A. HERRMANN

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.1962

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methodik	3
1.	Untersuchungsgut	3
2.	Biologische Bestimmung der insulinähnlichen Aktivität	3
3.	Enzymatische Glucose-Bestimmung	10
4.	Enzymatische Milchsäure-Bestimmung	11
5.	Vorversuche	13
III.	Ergebnisse	15
1.	Kasuistische Darstellung der Hauptversuche	15
2.	Tabellen	26
3.	Abbildungen	33
IV.	Diskussion	40
V.	Zusammenfassung	46
VI.	Literaturverzeichnis	47
VII.	Lebenslauf	48

I. Einleitung.

Von Rerold und Mitarbeitern wurde vor einigen Jahren eine biologische Methode zur quantitativen Insulinbestimmung entwickelt, die inzwischen von anderen Autoren angewandt und modifiziert worden ist (1). Diese Methode bedient sich der Stoffwechselaktivität des epididymalen Fettanhanges der Ratte, der in vitro je nach Höhe der Insulinkonzentration ^{14}C-1- markierter D-Glucose in verschiedenem Ausmaß zu $^{14}CO_2$ oxydiert. Es wurde mehrfach darauf hingewiesen, daß man die mit dieser Methode gewonnenen Ergebnisse der $^{14}CO_2$ -Messung streng genommen nicht als Insulinaktivität, sondern als insulinähnliche Wirkung (insulin like activity im englischsprachigen Schrifttum) bewerten muß, da auch durch andere Substanzen ein solcher Effekt hervorgerufen werden kann. So wurde von einer Steigerung der "insulin like activity" durch Glucagon, Adrenalin und Oxytocin (2, 3, 4) berichtet. Man spricht daher von einer insulinähnlichen Aktivität einer Substanz, wenn durch diese eine Änderung der basalen Glucoseoxydation bewirkt wurde. Aus solchen Befunden ergab sich zwar eine Einschränkung für die Spezifität des Verfahrens im Hinblick auf die Insulinbestimmung, andererseits aber eröffneten sich Möglichkeiten, den fördernden oder hemmenden Effekt der genannten und auch anderer Substanzen auf die Glucoseoxydation am Fettgewebe zu prüfen.

Von besonderem Interesse war in diesem Zusammenhang die Testung der oralen Antidiabetika vom Typ der Sulfonylharnstoffe und der Biguanide, die in den vergangenen Jahren in die Klinik eingeführt worden waren. Während von verschiedenen Autoren übereinstimmend festgestellt wurde, daß die Sulfonylharnstoffe offensichtlich ohne Einfluß auf die Glucoseoxydation am Rattenfettgewebe sind (5), gehen hinsichtlich eines solchen Effektes bei den Biguaniden die Meinungen weit auseinander. (5, 6, 7, 8, 9, 10). Bei Verwendung hoher Biguanidkonzentrationen berichteten verschiedene Autoren über eine Hemmung der Glucoseoxydation und auch über eine Hemmung des Effektes gleichzeitig mitinkubierter Insulinmengen (5). Andererseits existieren aber Mitteilungen (7, 8, 9, 10), daß Biguanide in niedrigen Konzentrationen die Glucoseoxydation

offensichtlich nicht nur nicht hemmen, sondern sogar fördern. Letzterer Befund schien umso bemerkenswerter zu sein, als dabei Biguanidkonzentrationen zur Anwendung kamen, die wesentlich besser den in der Klinik verabreichten therapeutischen Dosen entsprachen als jene hohen Biguanidkonzentrationen, mit denen die zitierten Autoren die Hemmung der Glucoseoxydation beobachtet hatten. Am Nebenhodenfettgewebe der alloxandiabetischen und nichtdiabetischen Ratte hat Jüttner (11) diese Frage einer erneuten Prüfung unterworfen. Die Ergebnisse von Jüttner, - die mit derselben Versuchsanordnung gewonnen wurden, wie sie bei unseren Untersuchungen Verwendung fand - , werden zum Vergleich der eigenen Resultate diskutiert werden.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit sollte sein, die Beeinflussung der Glucoseoxydation durch Biguanide am Fettgewebe von diabetischen und nichtdiabetischen Menschen zu testen. Über die Bestimmung der insulin like activity am Fettgewebe von Menschen liegen bislang nur ganz vereinzelte Mitteilungen vor. (10). Autoren, die wie Mirsky (12, 13) u.a. mit dieser Versuchsanordnung gearbeitet hatten, betonen, daß das Fettgewebe des Menschen durchweg eine geringe Stoffwechselaktivität aufweist und daß deswegen der epididymale Fettanhang der Ratte besser geeignet sei. Bei dieser Arbeit sollten am Fettgewebe des Menschen nicht Insulinkonzentrationen bestimmt werden, sondern Untersuchungen durchgeführt werden, die zur Klärung des Wirkungsmechanismus der Biguanide beitragen sollen. Wegen der klinischen Beobachtung, daß nur Diabetiker, nicht jedoch gesunde Versuchspersonen mit einer Blutzuckersenkung nach Verabreichung von Biguaniden reagieren, sollte zu unseren Untersuchungen Fettgewebe sowohl von diabetischen als auch von nichtdiabetischen Menschen herangezogen werden. Durch Prüfung der Beeinflussung der Glucoseoxydation bei niedrigen und hohen Biguanidkonzentrationen sollte gleichzeitig zu der oben erwähnten Frage, ob die Biguanide in verschiedenen Konzentrationen verschiedene Effekte entfalten, Stellung genommen werden.

II. Material und Methodik.

1. Untersuchungsgut.

Das bei unseren Untersuchungen verwendete menschliche Fettgewebe wurde diabetischen und nichtdiabetischen Patienten während einer Operation in Vollnarkose entnommen. Die teils männlichen, teils weiblichen Patienten gehörten verschiedenen Altersstufen an und waren verschiedener Konstitution. Von Nichtdiabetikern wurde meistens subcutanes, in einigen Fällen mesenteriales und retroperitoneales Fettgewebe bei Laparatomien entnommen; von Diabetikern fiel in den meisten Fällen subcutanes Fettgewebe bei Amputationen der unteren Extremitäten an. Da es bei der Durchführung der Versuche aus technischen Gründen nicht möglich war, das Gewebe jedesmal sofort nach der Entnahme aus dem Organismus an Ort und Stelle in die vorbereiteten Warburggefässe zu bringen, wurden die Gewebsproben in eisgekühlte Ringerlösung gelegt und so zur Aufarbeitung in das Labor transportiert.

Die Zeitspanne von der Entnahme des Fettgewebes bis zur Inkubation betrug mindestens 20 min, in vielen Fällen mehr, je nach Länge des Transportweges. Nur in einem Fall (lfde. Nr.16) wurde das Gewebe 7 ½ stdn. bei ca. 3° C in Ringerlösung aufbewahrt, ohne daß sich die Ergebnisse dadurch von den Resultaten anderer Versuche unterschieden hätten.

2. Biologische Bestimmung der insulinähnlichen Aktivität.

Zur Bestimmung der Insulinkonzentration wurde die Methode von Renold und Mitarbeitern verwendet. Diesem Nachweis liegt folgendes Prinzip zugrunde:

Im Nebenhodenfettgewebe der juvenilen Ratte, das sich durch einen besonders lebhaften Stoffwechsel auszeichnet, wird Glucose in Anwesenheit von Insulin offenbar vorwiegend über den Pentosephosphat-Cyclus abgebaut. Das bei dieser Reaktion entstehende CO_2 ermöglicht den Nachweis von Insulin, wenn man zusammen mit dem Fettgewebe das auf seinen Insulingehalt zu untersuchende Medium sowie radioaktive Glucose, die am C_1 markiert ist, inkubiert. Das Ausmaß der Insulinwirkung läßt sich aus

dem beim Glucoseabbau gebildeten $^{14}CO_2$ - Anteil berechnen. Bei Zusatz anderer Substanzen - zusammen mit oder an Stelle von Insulin - kann festgestellt werden, ob diese Substanzen ebenfalls eine insulinähnliche Wirkung hinsichtlich der CO_2 - Bildung aufweisen oder womöglich eine Hemmung der Glucoseoxydation bewirken. Definitionsgemäß spricht man im Hinblick auf die gewonnenen CO_2 - Werte deswegen, wie erwähnt, nicht von einer Insulinaktivität, sondern von einer insulinähnlichen Aktivität ("insulin like activity").

Es konnte mehrfach gezeigt werden - zur Erfassung der Dosis-Wirkungsbeziehungen - , daß die Korrelation des Logarithmus der Insulinkonzentration mit der Quadratwurzel aus der gemessenen und auf mg Fettgewebe umgerechneten Impulszahl/min einen linearen Verlauf ergibt. Das während des Versuchs aus dem C-1-Atom des Glucosemoleküls gebildete $^{14}CO_2$ wird an eine organische Base (Hyamin) gebunden. Die Gesamtradioaktivität wird durch Scintillationsmessung bestimmt. Zur Auswertung der Resultate benötigt man 2-3 Eichwerte, wofür vorgegebene Insulinkonzentrationen zwischen 25 und 1000 µ E pro ml inkubiert werden. Die Insulinaktivität der Proben wird mit Hilfe eines graphischen Verfahrens errechnet. Dazu bedient man sich eines Koordinatensystems, auf dessen logarithmisch unterteilter Abszisse die Insulinkonzentrationen angegeben werden und auf dessen linear unterteilter Ordinate die Quadratwurzeln aus den gemessenen und auf mg Fettgewebe umgerechneten Impulszahlen/min eingetragen sind. Die Errechnung der Quadratwurzeln erfolgt nach folgender Formel:

$$\sqrt{\frac{\text{Impulszahl/min - Null-Effekt}}{\text{mg Fettgewebe}}}$$

Mit Hilfe einer durch die Eichwerte festgelegten Geraden sind die Insulinkonzentrationen der untersuchten, unbekannten Proben an der Abszisse abzulesen, nachdem man die Meßwerte nach der obigen Formel umgerechnet und auf der Ordinate eingetragen hat.

Zur Ermittlung der Ergebnisse einer Meßreihe soll das Nebenhodenfettgewebe von nur einer Ratte verwendet werden, da das Fettgewebe verschiedener Tiere einen unterschiedlichen Stoffwechsel aufweist. Nur bei Erfüllung dieser Bedingungen sind quantitativ vergleichende Aussagen möglich.

Bei dieser Arbeit geht es nicht um die Bestimmung der Insulinkonzentrationen am menschlichen Fettgewebe, sondern, wie schon oben gesagt wurde, darum, die quantitative Beeinflussung der Glucoseoxydation durch Biguanide am menschlichen Fettgewebe festzustellen. Es wurde daher an Stelle von Nebenhodenfettgewebe von Ratten menschliches Fettgewebe verwendet. Das Ausmaß der Biguanidwirkung am menschlichen Fettgewebe läßt sich aus dem beim Glucoseabbau gebildeten und gegenüber dem Leerwert veränderten $^{14}CO_2$ - Anteil erkennen, der je nach Anstieg oder Abfall anzeigt, ob eine Hemmung oder eine Förderung der Glucoseoxydation bewirkt wurde. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen hinsichtlich der $^{14}CO_2$ - Bildung wurden nicht in uE Insulin, sondern in Form des oben angegebenen, allgemein gebräuchlichen Wurzelausdruckes wiedergegeben. Dadurch wird ein Vergleich mit den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren ermöglicht.

Reagenzien:
Zur Durchführung der biologischen Bestimmung der insulinähnlichen Aktivität werden folgende Lösungen benötigt:

I. Schwefelsäure p.a. 10 %ig

II. Krebs-Ringerlösung:

NaCl	8,26 g	= 141,0 mMol
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	335,9 mg	= 2,284 "
KCL	422,0 mg	= 5,66 "
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	350,0 mg	= 1,42 "
KH_2PO_4	193,5 mg	= 1,42 "
	ad 1000 ml aqua bidestillata	

III. Natriumbicarbonatlösung:

$NaHCO_3$	2,875 g	= 34,2 mMol
	ad 200 ml aqua bidest.	

IV. Glucose (sog."stumme" Glucose):

$C_6H_{12}O_6$	16,25 g	= 90,3 mMol
	ad 100 ml aqua bidest.	

V. Atmungsgemisch:

95 % CO_2

5 % CO_2

VI. Inkubationslösung:

Folgende Lösungen werden in der angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert:

1. 54,5 ml Krebs-Ringer-Lösung,
2. 650 mg trockene Gelatine; diese unter schwachem Erwärmen in 1. in einem Erlenmeyerkolben auflösen; diese Lösung dann abkühlen.
3. 1 ml "stumme" Glucose;
4. 9,5 ml Na-Bicarbonatlösung, die vorher 5 min. lang mit reinem CO_2 begast wurde.

Dieses Gemisch wird 10 min lang mit Atmungsgemisch begast und anschließend ca. 2 min. lang geschüttelt. Damit stellt sich ein pH-Wert von ca. 7,4 - 7,5 ein (Kontrolle am pH-Meter).

VII. Radioaktiv markierte Glucose:

^{14}C-1-Glucose. Der Inhalt einer Ampulle - 0,1 m Curie - wird in 50 ml aqua bidest. gelöst. 0,1 ml dieser Lösung entsprechen einer Radioaktivität von 0,2µCurie.

VIII. Insulin - Lösungen:

1. Standard-Lösung: 9,1 mg Schweine - Insulin (10 mal umkristallisiert, glukagonfrei, 0,39 % Zinkgehalt) werden in 10 ml $\frac{n}{10}$ HCl gelöst.

   1 ml dieser Lösung enthält 20 IE Insulin.

2. Lösung a : 0,1 ml Standardlösung ad 100 ml mit aqua bid. verdünnen. 100 ml a-Lösung enthalten 2 IE Insulin.
3. Lösung b : 0,5 ml der Lösung a ad 10 ml mit Inkubationslösung verdünnen. 1 ml dieser Lösung enthält 1000 µE Insulin.
4. Lösung c : 0,5 ml der Lösung b ad 10 ml mit Inkubationslösung verdünnen. 1 ml dieser Lösung enthält 50 µE Insulin.

Die Insulinlösung a wird bei 0 - 2° gehalten; die Lösungen b und c sind 2 Tage haltbar; sämtliche anderen Lösungen werden in gefrorenem Zustand aufbewahrt.

IX. Butylbiguanid - Lösungen:

50 mg Butylbiguanid werden in 50 ml Periston isoton gelöst, entsprechend einer Konzentration von 100 mg %. Davon ausgehend stellt man sich durch Verdünnung mit Periston folgende Konzentrationen her:

50	10	5	2,5	1	0,5	0,25	0,1	mg % Butylbiguanid
500	100	50	25	10	5	2,5	1	γ/ml

X. Scintillator - Flüssigkeit:

4,0 g Diphenyloxazol (PPO)
0,1 g 1,4 -bis -2- (5-Phenyloxazolyl) -Benzol (POPOP)
ad 1000 ml Toluol p.a.

XI. Hyamin = 1 molare Lösung von p- (Diisobutyl-Cresoxyäthoxyäthyl)-Dimethylbenzylammoniumhydroxyd in Methanol.

Die Substanzen, die unter X. und XI. angegeben sind, werden von der Firma Packard & Co. La Grange Illinois geliefert.

Beschreibung des Reaktionsgefässes:

Die Reaktion läuft in einem sogenannten nach Lamprecht und Schäfer modifizierten Warburg-Trog ab, einem kleinen kolbenförmigen Glasgefäß mit ebenem Boden und zwei kleineren seitlichen, sowie einer größeren oberen Öffnung. Diese Öffnungen sind eingeschliffen und können mit dazu passenden Schliffkegeln verschlossen werden. In die große obere senkrechte Öffnung wird ein sog. großer Kamin (Glasrohr mit Schliffkegel) eingesetzt, der oben mit einem Gummistopfen verschlossen ist, mittels einer durch den Stopfen gestochenen Kanüle mit einem Schlauchsystem in Verbindung steht und zur Begasung dient (siehe Durchführung des Versuchs). Die kleine seitliche senkrechte Öffnung wird mit einem kleinen eingeschliffenen Kamin (Kapillarrohr) verschlossen. Durch Drehung des Kamins kann der Troginnenraum gegen die Aussenluft abgeschlossen werden. Die seitliche schräge Öffnung trägt einen eingeschliffenen birnenförmigen Seitentrog, dessen Tubus durch eine Gummikappe fest ver-

schlossen ist. Im Hauptraum des Troges befindet sich außerdem ein kleines zylindrisches Glasgefäß (Magnettrog), welches durch einen aussen angebrachten Magneten gehalten wird.

Durchführung der Bestimmung:

1. In den trockenen Trog wird der Magnettrog eingesetzt und in diesen werden 0,2 ml 10 %ige Schwefelsäure einpipettiert.
2. Auf den Boden des Troges werden 0,1 ml ^{14}C-1-Glucoselösung pipettiert.
3. Für eine Versuchsreihe werden
   in einen Trog 0,5 ml Krebs-Ringer-Lösung einpipettiert=Leerwert (siehe unten),
   in einen Trog 0,5 ml Insulinlösung b,
   in einen Trog 0,5 ml " " c,
   in die restlichen Tröge werden jeweils 0,5 ml einer Butylbiguanidlösung einpipettiert.
4. Zusätzlich werden in jeden Trog 2,0 ml Inkubationslösung (VI) einpipettiert.
5. Die Tröge werden mittels Gummistopfen und der kleinen Kamine fest verschlossen und auf der Analysenwaage auf 0,0001 g Genauigkeit abgewogen.
6. Inkubieren des Fettgewebes:
   Das während der Operation entnommene menschliche Fettgewebe wird in eisgekühlte Ringerlösung gegeben, in kleine Stücke von je 100 - 150 mg zerschnitten und möglichst schnell dem Troginhalt zugesetzt.
7. Die Tröge werden nochmals gewogen. Die Gewichtsdifferenz ergibt die Fetteinwaage pro Trog.
8. Die mit den Gummikappen verschlossenen Seitentröge werden angebracht, die großen Kamine aufgesetzt und die kleinen Kamine geöffnet. Der gesamte Trog wird nun an einer Stativstange befestigt im Warburg-Apparat auf 37° erwärmt.
9. Nun werden die großen Kamine an den Gasverteiler angeschlossen und der Troginhalt wird 5 min lang mit Atmungsgemisch begast.
10. Danach werden die kleinen Kamine verschlossen; ebenso die großen Kamine nach Abnahme der Gasverteilung.
11. 3 Stunden Inkubation unter Schütteln im Wasserbad von 37° Grad.

12. Die Tröge werden aus dem Warburg-Apparat genommen und an ein Stativ gehängt. Mit einer Tuberkulinspritze werden 0,4 ml des unter Stickstoffatmosphäre aufbewahrten und entnommenen Hyamin in jeden Seitentrog durch die Gummikappen eingespritzt.Danach werden die Magnete abgezogen,um die Magnettröge umfallen zu lassen und dadurch die Schwefelsäure in das Inkubationsgemisch zu bringen.Damit werden alle biologischen Reaktionen gestoppt (Enteiweissung) und das gesamte CO_2 wird freisetzt.
13. Die Tröge werden zur vollständigen Austreibung der Kohlensäure aus der Inkubationslösung für weitere 2 Stdn. in verschlossenem Zustand bei 37° C in den Warburg-Apparat gebracht und geschüttelt.Dabei wird das CO_2 quantitativ vom Hyamin (im Seitentrog) absorbiert.
14. Die Tröge werden aus dem Warburg-Apparat wieder herausgenommen und andas Stativ gehängt.Die Seitentröge werden abgenommen und das darin enthaltene Hyamin mit 4x2 ml Scintillator-Toluol-Gemisch in kaliumarme verschliessbare Glasgefässe gespült. (Spezialzählgläschen für das Flüssigkeits-Scintillations-Spectrometer).
15. Die Radioaktivität des $^{14}CC_2$ wird im automatisch registrierenden Radiospectrometer (Packard-Gerät) gemessen. Ausserdem wird ein Aliquot der Inkubationlösung zur Glucose- und Milchsäureanalyse entnommen.

3.Enzymatische Glucose-Bestimmung.

Dem Test liegen folgende gekoppelte Reaktionen zugrunde:

a) Glucose + H_2O + O_2 $\xrightarrow{GOD}$ Glucuronsäure + H_2O_2

b) H_2O_2 + DH_2 $\xrightarrow{POD}$ $2H_2O$ + D

GOD = Glucoseoxydase
POD = Peroxydase
DH_2 = o-Dianisidin(Chromogen)

Als Messgrösse dient die Bildung des rotbraunen Farbstoffes „D".
Die Wellenlänge der Mess-Strahlung beträgt 436nm.
Die für die Reaktionen benötigten Enzyme GOD und POD sind im "Glucose-Reagens" der Test-Combination der Fa.C.F.Boehringer/Mannheim enthalten.

Durchführung:

1. Dem zu untersuchenden Inkubationsmedium wird 0,1 ml Probe entnommen,mit 3,3 %iger Perchlorsäure enteiweisst und 5-10 min lang zentrifugiert(ca.3000 U/min).
2. Als Reagentien werden verwendet:
   a) Glucose-Reagens: 100 ml Puffer-Lösung(enthält die Enzyme)
   1,0 ml Chromogen
   b) Glucose-Standard-Lösung: 91 γGlucose/ml
3. Bestimmungsansatz:
   a) Reagenzien-Leerwert: 5,0 ml Glucose-Reagens
   0,2 ml Aqua bidest.
   b) Glucose-Standard-Wert: 10,0 ml Glucose-Reagens
   0,4 ml Glucose-Standard-Lösg.
   c) zu untersuchende Probe: in je ein Reagensglas je
   5,0 ml Glucose-Reagens
   0,2 ml enteiweissten Lösungsüberstand.
4. Die Ansätze bleiben 35 min bei Zimmertemperatur stehen. Nach dieser Zeit wird die Extinktion aller Proben,sowie die des Glucose-Standard-Wertes gegen die Extinktion des Reagenzien-Leerwertes in 1cm-Küvetten gemessen.

5.Berechnung.

Um den Glucosegehalt im ml Testlösung zu erhalten,bezieht man die Messung auf die Extinktion der Glucose-Standard-Lösung.Der Glucose-Standard-Wert enthält 18,2 γ Glucose pro Reaktionsansatz;es ist also

$$\frac{\Delta E_{Probe}}{\Delta E_{Standard}} \times 100 = \text{mg\% Glucose}$$

4.Enzymatische Milchsäure-Bestimmung.

Der Bestimmung liegt folgende Reaktion zugrunde,welche von Lactatdehydrogenase (LDH) katalysiert wird:

$$L\text{+Lactat} + DPN^{+} \rightleftharpoons Pyruvat + DPNH + H^{+}$$

DPN^{+} = Diphosphopyridinnucleotid
DPNH = reduziertes DPN^{+}

Die Bestimmung des Lactats erfolgt durch Messung der DPNH-Absorption im Photometer;das entstandene DPNH dient somit als Messgrösse.
Die Wellenlänge der Mess-Strahlung beträgt 366nm.
Als Reagentien werden verwendet:

1) Lactatdehydrogenase (LDH); c = 1,d.h.1mg/ml Kristallsuspension;
2) Diphosphopyridinnucleotid (DPN^{+}); c = 20mg/ml;
Beide Substanzen sind in der Test-Combination der Fa.C.F. Boehringer/Mannheim enthalten.
3) Glycin-Hydrazin-Puffer:
Glycin 18,767 g ad 250 ml aqua bidest.
Hydrazin-Sulfat 13,013 g ad 250 ml aqua bidest.
Beide Lösungen werden miteinander gemischt.
Für die Durchführung von Analysen wird jedesmal nur die dafür nötige Menge dieses Puffers kurz vor dem Gebrauch mit konzentrierter NaOH auf einen pH-Wert von 9,8 eingestellt.

Durchführung:

1. Dem Troginhalt wird 1 ml Probe entnommen und mit 1 ml 6%iger Perchlorsäure enteiweisst,anschliessend 5 - 10min lang zentrifugiert.

2. Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand abgegossen und mit Kaliumcarbonatlösung auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt.(Verwendung von Spezial-Indikator-Papier von Merck)
3. In die Mess-Küvetten werden in folgender Reihe pipettiert:

   0,2 ml DPN$^+$
   0,1 ml Probe
   2,0 ml Puffer

4. Die Mess-Küvetten werden in das Eppendorf-Photometer gestellt.Beide Nullpunkte werden eingestellt.
5. Der Start der Testreaktion erfolgt durch Zugabe von 0,03ml LDH zur Mess-Küvette.Man vergleicht die Extinktion der Mess-Küvette mit dem Blindwert in Abständen von 1 min. Nach etwa 18-20 min soll der Test beendet sein,d.h.die Extinktionsänderung pro Minute soll über einen grösseren Zeitraum konstant bleiben.
6. Die zur Berechnung eingesetzte Extinktionsdifferenz(=ΔE) ermittelt man durch graphisches Extrapolieren.Die abgelesenen ΔE-Werte (Ordinate)trägt man auf Millimeterpapier gegen die Zeit (Abszisse)auf.An den in eine Lineare übergehenden Teil der Kurve (Schleich) legt man eine Tangente an.Der Schnittpunkt derselben mit der Achse t_o(t_o = Zeitpunkt des Starts der Reaktion) gibt die wahre Extinktionsänderung ΔE an.
7. Die Berechnung der in der Probe enthaltenen Menge Milchsäure erfolgt nach der Formel:

$$\frac{\Delta E \times V_{Küvette}}{3{,}3 \times 1000 \times 0{,}1 \times 1} = \mu Mol/ml \text{ enteiweisste Testsubstanz}$$

$\frac{\Delta E}{1000}$ = Extinktionsänderung

3,3 = molarer Extinktionskoeffizient von DPNH bei 366nm

0,1 = Volumen der enteiweissten Testsubstanz

1 = Schichtdicke der Küvette (=Lichtweg)

5. Vorversuche.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit machte es vor Beginn der eigentlichen Hauptversuche, wie sie in Teil II geschildert wurden, notwendig, einige Vorversuche durchzuführen.

a) Zunächst war zu ermitteln, mit welcher Fehlerbreite, d.h. mit welchem mittleren Fehler der Einzelmessung bei der beschriebenen Methodik zu rechnen ist. Dazu wurde in einer besonderen Versuchsreihe - ohne Zusatz von Biguanid und Insulin- am selben Fettgewebe 5mal der Leerwert, d.h. die basale Glucoseoxydation des Fettgewebes ermittelt. Aus den Meßergebnissen dieser fünf Einzelversuche wurde der mittlere Fehler des Leerwerts errechnet. Dieser Wert wurde als verbindlich auch für den mittleren Fehler der übrigen Einzelversuche - mit und ohne Zusatz von Biguanid oder Insulin - am menschlichen Fettgewebe angesehen. Es kann nämlich mit sehr großer Wahrscheinlichkeit gesagt werden, daß der mittlere Fehler von Versuchen mit Fettgewebe anderer Individuen - innerhalb einer Spezies - in einem ähnlichen Bereich liegt. Gelegentlich wurden von uns Einzelversuche doppelt ausgeführt. Dabei zeigten sich ähnliche Abweichungen der Meßwerte voneinander wie bei der oben genannten Versuchsreihe der Leerwerte, deren CO_2 -Werte nachstehend wiedergegeben sind:

$\sqrt{\text{Jpm-Nulleffekt/mg Fettgewebe}}$:	1,232	1,192	1,284	1,342	1,140

Die Errechnung des mittleren Fehlers der Einzelmessung geschieht nach der Formel:

$$f_m = \pm\sqrt{\frac{(f_i)^2}{n-1}}$$

n = Anzahl der Einzelmessungen

i = Anzahl der absoluten Fehler der Einzelmessungen

f = absoluter Fehler der Einzelmessung = $m - \mathfrak{M}$

$(f_i)^2$ = Summe der Fehlerquadrate

$\mathfrak{M} = \frac{m_1+m_2+ \ldots m_n}{n}$ = arithmetisches Mittel aller Einzelmessungen.

Für den Leerwert wurde ein mittlerer Fehler von ±0,0908 errechnet. Setzt man den Mittelwert aller Leerwerte = 100 %, so beträgt der mittlere Fehler der Einzelmessung ± 7,28 %.

Zur Beurteilung der Messergebnisse sämtlicher Einzelversuche wurde der doppelte mittlere Fehler des Leerwerts berücksichtigt, d.h. es wurden nur diejenigen Messergebnisse als signifikant angesehen, die unter dem Einfluss von Butylbiguanid ausserhalb dieses Bereichs liegen.

Aus rein technischen Gründen wurde die ständige Durchführung von Doppel - oder Mehrfachbestimmungen von Einzelversuchen praktisch unmöglich gemacht, da wir ja besonderen Wert auf die Erfassung einer möglichst grossen Zahl von verschiedenen Biguanidkonzentrationen legten, uns jedoch nur 12 Inkubationsgefässe zur Verfügung standen.

b) Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen verglichen werden mit den Resultaten gleichartiger Untersuchungen, die von Jüttner am epididymalen Fettanhang gesunder und alloxandiabetischer Ratten durchgeführt wurden.

Dies ist deswegen möglich, weil die Versuchsbedingungen in beiden Arbeiten sehr ähnlich waren. Das Nebenhodenfettgewebe der Ratte wurde folgerichtig wie das menschliche Fettgewebe nach der Entnahme aus dem Organismus für kurze Zeit vor dem Inkubieren in eisgekühlte Ringerlösung gelegt. Insofern weicht die Methodik beider Untersuchungen von derjenigen anderer Autoren etwas ab, welche das Rattenfettgewebe sofort nach der Entnahme inkubierten. Um auszuschliessen, dass die Stoffwechselaktivität eines zunächst in Ringerlösung eingebrachten Fettgewebes gegenüber einem sofort inkubierten womöglich verändert wird, wurden einige vergleichende Untersuchungen mit derselben Probe menschlichen Fettgewebes vorgenommen. Bei einem Teil der Versuche wurde Fettgewebe vor dem Inkubieren in eisgekühlte Ringerlösung gebracht; bei einem anderen Teil wurde dasselbe Fettgewebe sofort nach Entnahme aus dem Organismus inkubiert. Bei diesen Untersuchungen ergab sich jedoch kein Hinweis dafür, dass durch das vorherige Einbringen des Fettgewebes in Ringerlösung die Stoffwechselaktivität desselben beeinträchtigt wird.

III.Ergebnisse.

1.Kasuistische Darstellung der Hauptversuche.

In der nachfolgenden kasuistischen Darstellung gelten folgende einheitliche Abkürzungen:

$^{14}CO_2$ = $^{14}CO_2$- Bildung aus ^{14}C-1-Glucose
Glucose = Glucoseaufnahme aus dem Inkubationsmedium in µMol/mg Fettgewebe
Lactat = Lactat-bzw.Milchsäurebildung in µMol/mg Fettgewebe
Leerwert = basale Glucoseoxydation des Fettgewebes

Die am Kopf der einzelnen Tabellen angegebenen Zahlen entsprechen den verwendeten Butylbiguanidkonzentrationen in pro 2,8 ml Inkubationsmedium.

Lfde.Nr.1: nichtdiabetischer Patient

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	1,836	0,082	0,012
0,5	1,0	0,0625	0,00913
2,5	1,061	0,0728	0,00755
5	1,927	0,0582	0,0077
12,5	1,275	0,0748	0,0074
25	1,218	0,0473	0,0090
bei gleichzeitiger Inkubation von 25 µE Insulin			
0,5	1,46	0,0258	0,01826
2,5	1,552	0,0235	0,00768
5	---	---	---
12,5	1,157	0,0329	0,02196
25	1,228	0,013	0,00748

Lfde.Nr.2: nichtdiabetischer Patient.

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	0,8013	0,0501	0,00413
0,5	0,81	0,0671	0,00404
2,5	0,7376	0,0783	0,00536
5	1,0	0,0731	0,00651
25	0,779	0,0512	0,00334
50	---	0,0676	0,00576
bei gleichzeitiger Inkubation von 25µE Insulin			
0,5	0,799	0	0,00997
2,5	0,712	0	0,00486
5	0,662	0,0097	0,00258
25	0,7483	0	0,01674
50	0,71	0,0092	0,00656

Lfde.Nr.3: nichtdiabetischer Patient.

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	0,7287	0,0014	0,0076
0,5	0,618	0,0489	0,0047
2,5	0,5348	0,0386	0,0388
5	0,6083	0,044	0,0059
12,5	0,6115	0,034	0,0057
25	0,8591	0,0499	0,0036
bei gleichzeitiger Inkubation von 25µE Insulin			
0,5	0,583	0	0,0067
2,5	0,576	0	0,0044
5	0,5916	0	0,0061
12,5	0,6663	0	0,0082
25	0,6285	0	0,0059

Lfde.Nr.4: nichtdiabetischer Patient.

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	0,6957	0,0311	0,0071
0,5	0,5301	0,0311	0,0007
2,5	0,6943	0,0501	0,0036
5	0,5311	0,0133	0,0028
12,5	0,5657	0,0355	0,0040
25	0,6899	0,0467	0,0154
bei gleichzeitiger Inkubation von 25µE Insulin			
0,5	0,6030	0,0014	0,0091
2,5	0,4388	0,0108	0,0035
5	0,4858	0,0024	0,0031
12,5	0,5069	0	0,0032
25	0,5357	0	0,0052

Lfde.Nr.5: nichtdiabetischer Patient.

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	0,7609	0,0282	0,0126
0,5	0,4123	0,0145	0,0008
1,25	0,2864	0,0123	0,0059
2,5	0,3016	0,0131	0,0018
5	0,2920	0,0116	0,0013
12,5	0,4929	0,0269	0,0021
bei gleichzeitiger Inkubation von 25µE Insulin			
0,5	0,3873	0,0046	0,0021
1,25	0,3578	0,0019	0,0014
2,5	0,2646	0,0042	0,0011
5	0,3347	0,0034	0,0023
12,5	0,3521	0,0023	0,0020

Lfde.Nr.6: nichtdiabetischer Patient.

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	2,724	0,0220	0,0176
0,5	3,974	0,0521	0,0480
2,5	3,838	0,0711	0,0190
2,5	3,843	0,0428	---
5	4,093	0,0629	0,0327
5	4,218	0,0650	---
25	3,066	0,0560	0,0290
25	3,168	0,0800	---
50	1,750	0,0409	0,0250
250	2,577	0,0866	---
50µE Ins.	3,901	0,0044	0,0263
1000µE "	3,708	0,0108	---

Lfde.Nr.7: nichtdiabetischer Patient.

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	2,648	0,0230	0,0171
0,5	2,456	0,0200	0,0173
2,5	3,037	0,0482	0,0152
2,5	2,877	0,0395	0,0104
5	2,731	0,0732	0,0218
5	2,535	0,0513	0,0136
25	2,524	0,0451	0,0266
25	1,401	0,0382	0,0089
50	1,627	0,0265	0,0114
250	1,654	0,0446	0,0177
50µE Ins.	1,792	0	0,0113
1000µE Ins.	3,023	0	0,0088

Lfde.Nr.8: nichtdiabetischer Patient.

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	2,446	0	0,0276
0,5	2,653	0,0027	0,0144
2,5	2,263	0,0581	0,0119
5	1,860	0,0547	0,0201

Lfde.Nr.9: nichtdiabetischer Patient.

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	0,6656	0	0,0121
0,5	0,3647	0	0,0082
1,25	0,5604	0,0320	0,0070
2,5	0,3194	0,0451	0,0025
5	---	0,0099	0,0163
12,5	0,6465	0,0298	0,0131
25	0,8060	0,0348	0,0137
50	0,3873	0,0320	---
250	0,7510	0,0280	0,0032
50µE Ins.	0,4438	0,0300	---
1000µE "	0,3987	0	0,0092

Lfde.Nr.10: nichtdiabetischer Patient.

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	1,0000	0,0562	0,0027
0,5	1,2040	0,0148	0,0024
2,5	0,9828	0,0206	0,0048
12,5	1,3270	0,0131	0,0030
50	0,9798	0,0190	0,0053

Lfde.Nr.11: diabetischer Patient W.P.

Blutzuckerwerte
am Operationstag : 408 mg%
einige Tage vor der Operation: 213 295 233 mg%
Insulingaben
vor der Operation : 20 E Altinsulin
an den Tagen vor der Operation: 25-35 " "

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	1,954	0,0411	0,0217
0,5	2,304	0,0640	0,0124
2,5	2,236	0,0585	0,0191
5	2,267	0,0582	0,0171
12,5	2,387	0,0511	0,0200
25	1,990	0,0506	0,0152
bei gleichzeitiger Inkubation von 25µE Insulin			
0,5	2,221	0,0604	0,0219
2,5	2,189	0,0454	0,0172
5	1,731	0,0407	0,0147
12,5	1,728	0,0370	0,0197
25	1,386	0,0397	0,0262

Lfde.Nr.12: diabetischer Patient B.E.

Blutzuckerwerte

am Tag vor der Operation : 300 mg%
am Tag der Operation,präoperativ: 197 mg%
am Tag nach der Operation : 215 mg%

Insulingaben

am Tag vor der Operation : 80 E Altinsulin
am Tag der Operation,präoperativ: 16 E " "
an den Tagen nach der Operation : 28 E " "

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	0,9823	0,0200	0,0067
Leerw.	0,9030	0,0226	0,0054
0,5	1,2100	0,0406	0,0117
2,5	1,0100	0,0471	0,0057
12,5	1,3580	0,0478	0,0064
50	0,4899	0,0349	0,0056
bei gleichzeitiger Inkubation von 25µE Insulin			
Leerw.	0,8390	0,0272	0,0059
Leerw.	1,0090	0,0428	0,0062
0,5	1,1400	0,0046	0,0078
2,5	1,0720	0,0165	0,0147
12,5	1,4040	0,0027	0,0085
50	0,6325	0,0073	0,0039

Lfde.Nr.13: diabetischer Patient J.P.

Blutzuckerwerte

am Tag vor der Operation : 100 151 131 mg%
am Tag der Operation : 124 144 176 150 mg%
am Tag nach der Operation: 87 148 136 mg%

Therapie

am Tag vor der Operation : 3 mal 1 Rastinon
am Tag der Operation : keine
an den Tagen nach der Operation: Diät

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	1,035	0,0218	0,0068
0,5	2,828	0,0207	0,0213
0,5	2,374	0,0368	---
1,25	2,549	0,0248	0,0111
1,25	2,368	0,0356	---
2,5	1,914	0,0189	0,0086
2,5	1,584	0,0228	---
5	2,368	0,0174	0,0079
5	1,511	0,0425	---
12,5	1,322	0,0179	0,0083
25	0,765	0,0200	0,0043

Lfde.Nr.14: diabetischer Patient P.R.

Blutzuckerwerte
an den Tagen vor der Operation: 430 425 325 200 mg%
Insulingaben
Tagesdosen Altinsulin vor der Operation: 36 40 56 56 56 E

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	1,942	0,0340	0,0140
0,5	1,835	0,0531	0,0135
1,25	2,398	0,0590	0,0150
2,5	1,759	0,0642	---
2,5	1,646	0,0362	0,0090
5	1,392	0,0590	---
5	1,661	0,0380	0,0136
12,5	1,428	0,0525	0,0125
25	1,192	0,0463	0,0159
50	0,956	0,0419	0,0141
250	0,922	0,0439	---

Lfde.Nr.15: diabetischer Patient L.J.

Blutzuckerwerte
an den Tagen vor der Operation: 232 238 mg%
Insulingaben
am Operationstag: ---
an den Tagen vor der Operation : 50-78 E Altinsulin
an den Tagen nach der Operation: 54 E " "

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	1,086	0,0705	0,0565
0,5	0,862	0,0643	0,0365
1,25	0,927	0,0516	0,0759
2,5	0,647	0,0474	0,0491
5	0,882	0,0504	0,0337
12,5	0,831	0,0540	0,0905
25	0,864	0,0636	0,0551
50	0,946	0,0494	0,0401
250	0,857	0,0414	0,0558
50 µE Ins.	0,986	0	0,0210
1000µE Ins.	1,081	0,0029	0,0880

Lfde.Nr.16: diabetischer Patient K.E.

Blutzuckerwerte
an den Tagen vor der Operation: 161 277 230 mg%
am Tag der Operation : 309 229 mg%
an den Tagen nach der Operation: 240 340 268 350 274 mg%
Insulingaben
an den Tagen vor der Operation : 24 E Altinsulin
am Tag der Operation : 10 E " "
an den Tagen nach der Operation: 48 E " "

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	0,9540	0,0380	0,0669
0,5	0,6520	0,0303	0,0242
1,25	0,8340	0,0347	0,0248
2,5	0,7470	0,0294	0,0355
5	0,6950	0,0326	0,0501
12,5	0,7310	0,0238	0,0334
25	0,7650	0,0256	0,0559
50	0,8900	0,0195	0,0189
250	0,7120	0,0302	0,0356

Lfde.Nr.17: diabetischer Patient Z.H.

Blutzuckerwerte
an den Tagen vor der Operation : zwischen 200 und 350 mg%
am Tag der Operation : 225 mg%
an den Tagen nach der Operation: unbekannt

Insulingaben
an den Tagen vor der Operation : 30 E Depotinsulin
am Tag der Operation : 10 E Altinsulin
an den Tagen nach der Operation: 36 E " "

	$^{14}CO_2$	Glucose	Lactat
Leerw.	0,8420	0,0133	0,0028
Leerw.	0,9192	0,0136	0,0019
Leerw.	1,2280	0	0,0034
0,5	1,4400	0,0201	---
1,25	1,2120	0,0248	---
2,5	1,2530	0,0250	---
5	0,8180	0,0167	---
12,5	2,1000	0,0165	---
25	1,9370	0,0238	---
50	0,8446	0,0131	---
250	0,7918	0,1708	---

2.Tabellen.

Im Folgenden wird versucht,die Ergebnisse unserer Experimente, soweit sie eine gewisse Gesetzmässigkeit aufweisen in Form von Tabellen und Abbildungen darzustellen.
Zum Vergleich wurden in diesen Tabellen und Abbildungen Ergebnisse berücksichtigt,die von Jüttner am Fettgewebe von diabetischen und nichtdiabetischen Ratten erhoben wurden.

Erklärung der in den Tabellen verwendeten Abkürzungen:

Max = maximale Werte innerhalb einer Versuchsreihe
Min = minimale Werte innerhalb einer Versuchsreihe
L = Leerwert = basale Glucoseoxydation
µ 2,8 ml = Butylbiguanid pro 2,8 ml Inkubationsflüssigkeit
ndM = nichtdiabetischer Mensch
dM = diabetischer Mensch
ndR = nichtdiabetische Ratte
dR = diabetische Ratte
M = dM + ndM
R = dR + ndR
D = dM + dR
ND = ndM + ndR
dmF = doppelter mittlerer Fehler

Tabelle I.

Der Einfluss verschiedener Butylbiguanidkonzentrationen auf die $^{14}CO_2$ - Bildung am Fettgewebe von diabetischen und nichtdabetischen Menschen und Ratten.Maximale Werte aller Versuchsreihen verglichen mit dem Leerwert.(Werte,die als grösser bzw.kleiner als der Leerwert angegeben wurden,mussten ausserhalb des doppelten mittleren Fehlers des Leerwertes liegen.)

	Werte ausserhalb des doppelten mittleren Fehlers d.Leerwertes		Werte innerhalb des doppelten mittleren Fehlers d.Leerwerts	
	Max < L	Max > L	Max < L	Max > L
dM	1	5	1	0
ndM	1	5	1	3
dR	0	3	1	3
ndR	0	4	3	3
M	2	10	2	3
R	0	7	4	6
D	1	8	2	3
ND	1	9	4	6

Tabelle II.

Der Einfluss verschiedener Butylbiguanidkonzentrationen auf die $^{14}CO_2$ - Bildung am Fettgewebe von diabetischen nichtdiabetischen Menschen und Ratten.Minimale Werte aller Versuchsreihen verglichen mit dem Leerwert. (Werte,die als grösser bzw.kleiner als der Leerwert angegeben wurden,mussten ausserhalb des doppelten mittleren Fehlers des Leerwerts liegen.)

	Werte ausserhalb des doppelten mittleren Fehlers d.Leerwertes		Werte innerhalb des doppelten mittleren Fehlers d.Leerwertes	
	Min < L	Min > L	Min < L	Min > L
dM	4	1	1	1
ndM	9	0	1	0
dR	7	0	0	0
ndR	9	1	0	0
M	13	1	2	1
R	16	1	0	0
D	11	1	1	1
ND	18	1	1	0

Tabelle III.

Der Einfluss verschiedener Butylbiguanidkonzentrationen auf die $^{14}CO_2$ - Bildung am Fettgewebe von diabetischen und nichtdiabetischen Menschen und Ratten.Verteilung der maximalen Werte aller Versuchsreihen auf Bereiche mit niedrigen und hohen Butybiguanidkonzentrationen.

	Max v. 0,5-5 γ/2,8ml	Max > 5 γ/2,8ml
dM	2	5
ndM	6	4
dR	5	2
ndR	8	2
M	8	9
R	13	4
D	7	7
ND	14	6

Tabelle IV.

Der Einfluss verschiedener Butylbiguanidkonzentrationen auf die $^{14}CO_2$ - Bildung am Fettgewebe von diabetischen und nichtdiabetischen Menschen und Ratten. Verteilung der minimalen Werte aller Versuchsreihen auf Bereiche mit niedrigen und hohen Butylbiguanidkonzentrationen.

	Min v. 0,5-5γ/2,8ml	Min > 5γ/2,8ml
dM	2	5
ndM	7	3
dR	2	5
ndR	0	10
M	9	8
R	2	15
D	4	10
ND	7	13

Tabelle V.

Der Einfluss verschiedener Butylbiguanidkonzentrationen auf die Glucoseaufnahme des Fettgewebes von diabetischen und nichtdiabetischen Menschen und Ratten. Maximale Werte aller Versuchsreihen verglichen mit dem Leerwert.

	Max < L	Max > L
dM	2	5
ndM	3	7
dR	1	6
ndR	2	8
M	5	12
R	3	14
D	3	11
ND	5	15

Tabelle VI.

Der Einfluss verschiedener Butylbiguanidkonzentrationen auf die Glucoseaufnahme des Fettgewebes von diabetischen und nichtdiabetischen Menschen und Ratten. Minimale Werte aller Versuchsreihen verglichen mit dem Leerwert.

	Min < L	Min > L
dM	4	3
ndM	5	5
dR	7	0
ndR	9	1
M	9	8
R	16	1
D	11	3
ND	14	6

Tabelle VII.

Der Einfluss verschiedener Butylbiguanidkonzentrationen auf die Glucoseaufnahme des Fettgewebes von diabetischen und nichtdiabetischen Menschen und Ratten. Verteilung der maximalen Werte aller Versuchsreihen auf Bereiche mit niederen und hohen Butylbiguanidkonzentrationen.

	Max v. 0,5-5γ/2,8ml	Max > 5γ/2,8ml
dM	6	1
ndM	7	3
dR	5	2
ndR	7	3
M	13	4
R	12	5
D	11	3
ND	14	6

Tabelle VIII.

Der Einfluss verschiedener Butylbiguanidkonzentrationen auf die Glucoseaufnahme des Fettgewebes von diabetischen und nichtdiabetischen Menschen und Ratten. Verteilung der minimalen Werte aller Versuchsreihen auf Bereiche mit niederen und hohen Butylbiguanidkonzentrationen.

	Min v. 0,5-5 γ/2,8ml	Min > 5 γ/2,8ml
dM	0	7
ndM	5	5
dR	3	4
ndR	5	5
M	5	12
R	8	9
D	3	11
ND	10	10

Tabelle IX.

Verteilung sämtlicher $^{14}CO_2$- Werte auf Bereiche mit verschiedenen Butylbiguanidkonzentrationen, unter Berücksichtigung des doppelten mittleren Fehlers des Leerwertes.

Werte oberhalb des doppelten mittleren Fehlers des Leerwertes wurden beobachtet bei:

ndM in 5 Versuchsreihen
dM in 5 Versuchsreihen
ndR in 4 Versuchsreihen
dR in 3 Versuchsreihen

ndM	0,5	1,25	2,5	5	12,5	25	50	250 f
oberhalb dmF	2	0	1	2	1	2	0	0
innerhalb dmF	3	0	5	2	1	3	1	2
unterhalb dmF	5	2	4	4	4	2	3	1
dM								
oberhalb dmF	4	3	2	2	4	2	0	0
innerhalb dmF	1	2	3	1	0	1	2	1
unterhalb dmF	2	1	2	3	3	3	3	3
ndR								
oberhalb dmF	1	2	3	4	3	0	0	0
innerhalb dmF	7	4	4	3	2	2	1	0
unterhalb dmF	1	2	3	3	5	7	6	5
dR								
oberhalb dmF	2	2	0	1	1	1	0	0
innerhalb dmF	3	2	4	1	2	4	1	0
unterhalb dmF	2	1	3	5	4	0	6	5

3.Abbildungen.

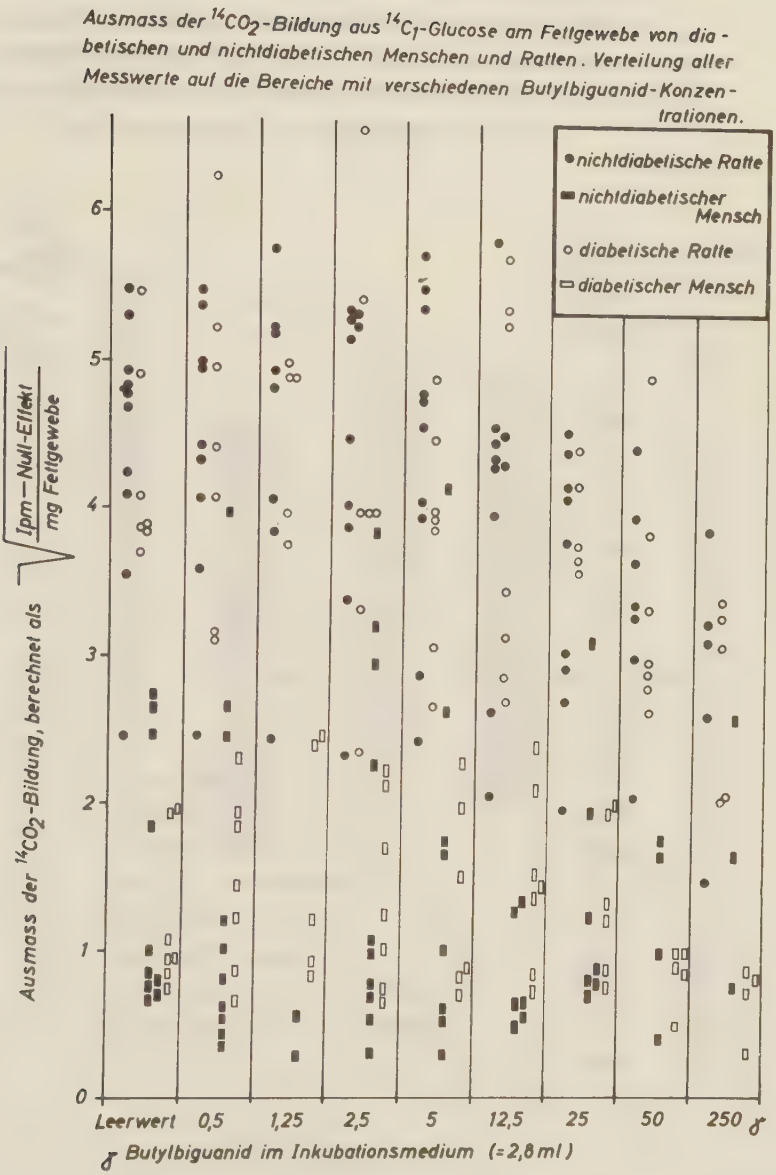

Abbildung 1

Der Einfluss verschiedener Butylbiguanid-Konzentrationen auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus $^{14}C_1$-Glucose am Fettgewebe von diabetischen und nichtdiabetischen Menschen und Ratten. Prozentuale Verteilung sämtlicher Werte, die über dem doppelten mittleren Fehler des Leerwertes liegen (= n), verteilt auf Bereiche mit niedrigen und hohen Butylbiguanid-Konzentrationen.

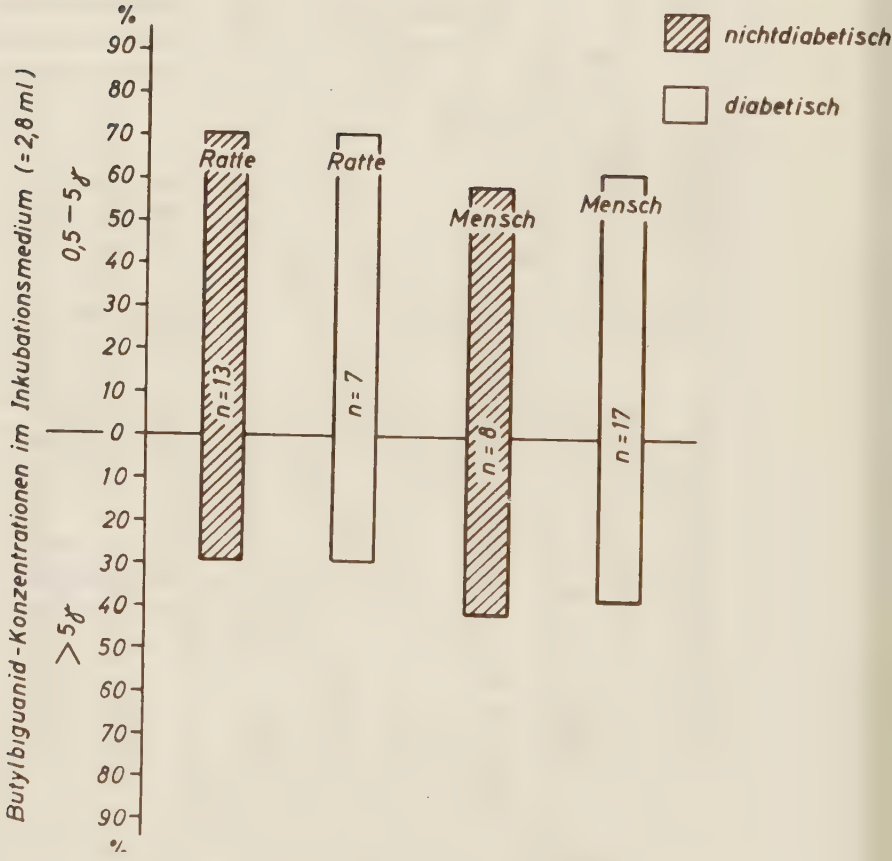

Abbildung 2

Der Einfluss verschiedener Butylbiguanid-Konzentrationen auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus $^{14}C_1$-Glucose am Fettgewebe von diabetischen und nichtdiabetischen Menschen und Ratten. Verteilung der maximalen Werte in Prozent bei n Versuchsreihen auf Bereiche mit niedrigen und hohen Butylbiguanid-Konzentrationen.

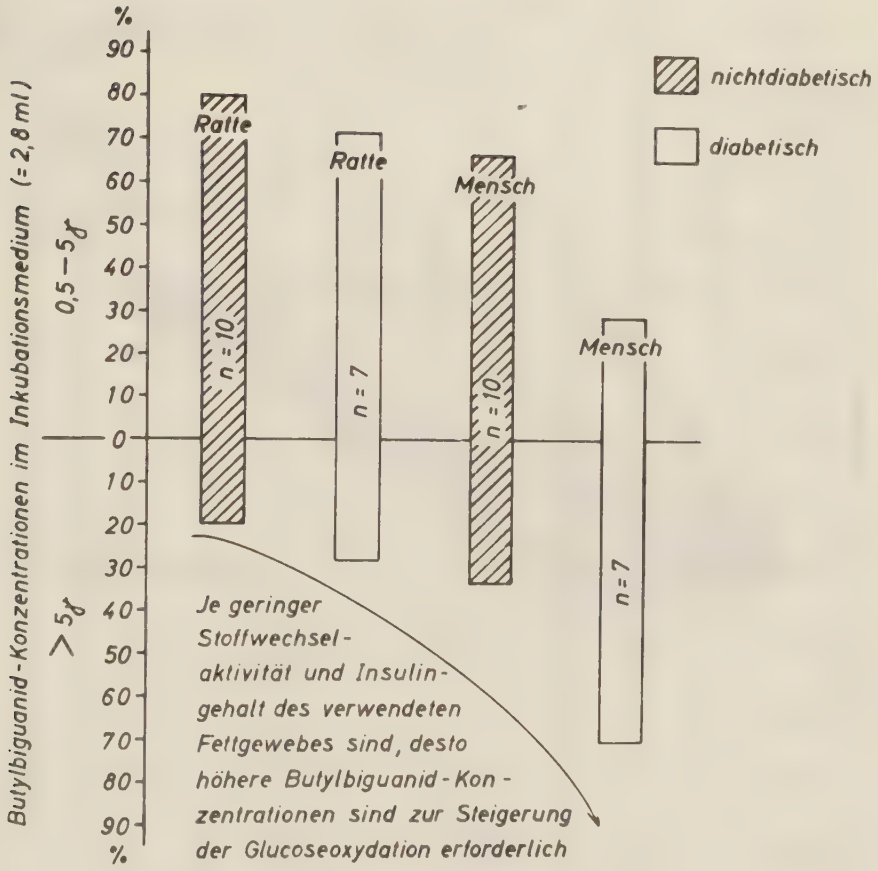

Abbildung 3

Der Einfluss verschiedener Butylbiguanid-Konzentrationen auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus $^{14}C_1$-Glucose. Maximale Werte in Prozent von jeweils einer Versuchsreihe (Leerwert = 100%), gewonnen am Fettgewebe von diabetischen und nichtdiabetischen Menschen und Ratten.

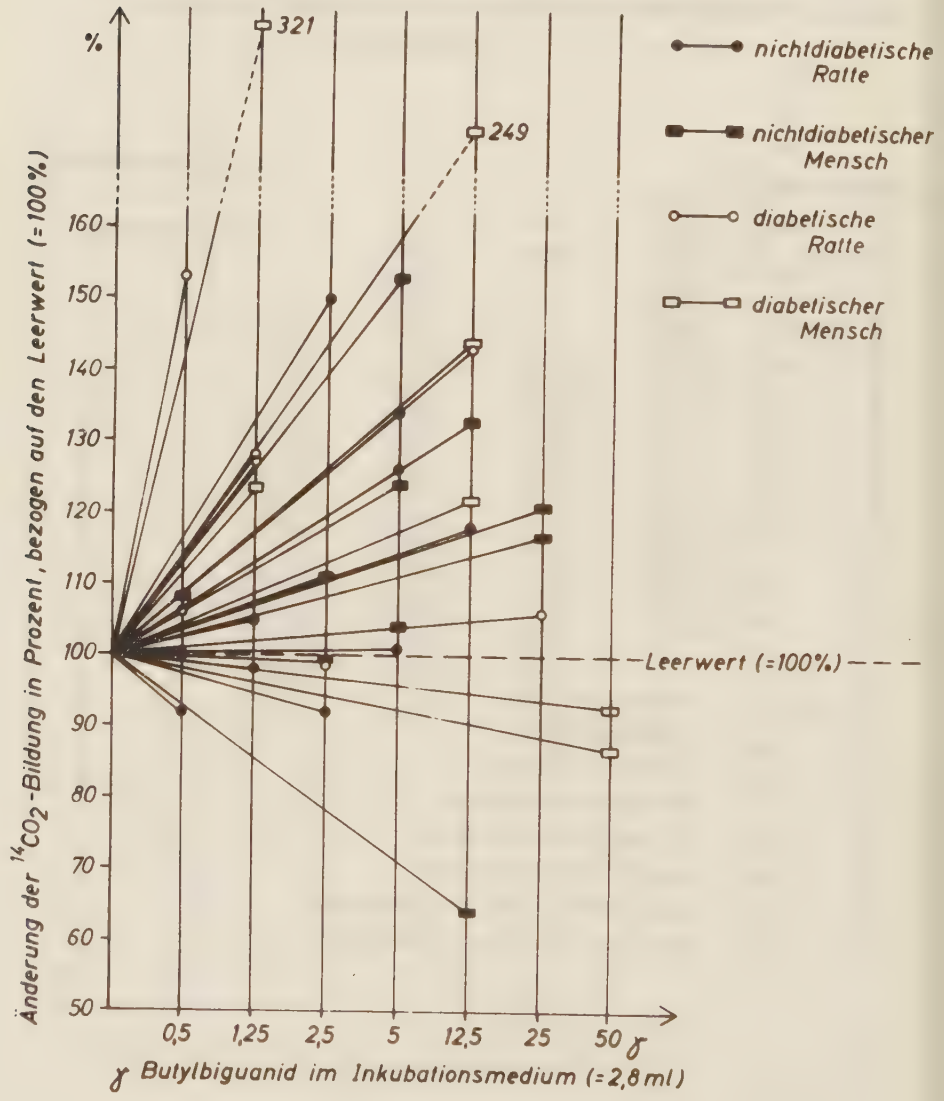

Abbildung 4

Der Einfluss verschiedener Butylbiguanid-Konzentrationen auf die $^{14}CO_2$-Bildung aus $^{14}C_1$-Glucose. Niedrigste Werte in Prozent von jeweils einer Versuchsreihe (Leerwert = 100%), gewonnen am Fettgewebe von diabetischen und nichtdiabetischen Menschen und Ratten.

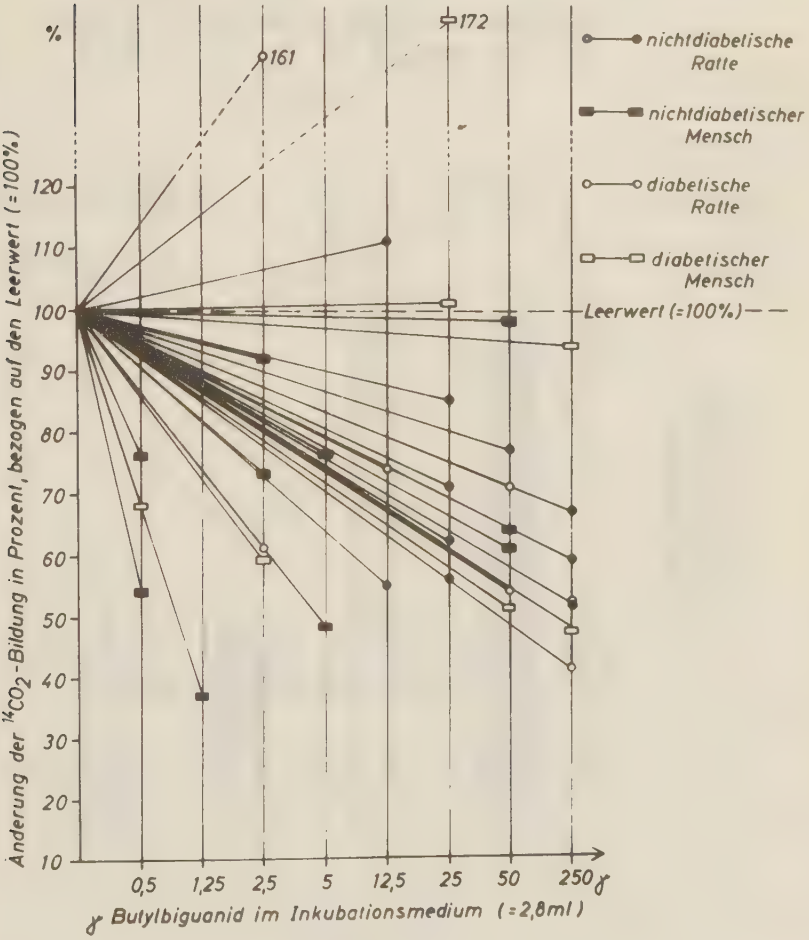

Abbildung 5

Basale Glucoseoxydation (=Leerwert) des nicht-diabetischen und diabetischen Fettgewebes von Menschen und Ratten gemessen am Ausmass der $^{14}CO_2$-Bildung aus $^{14}C_1$-Glucose bei n Versuchen.

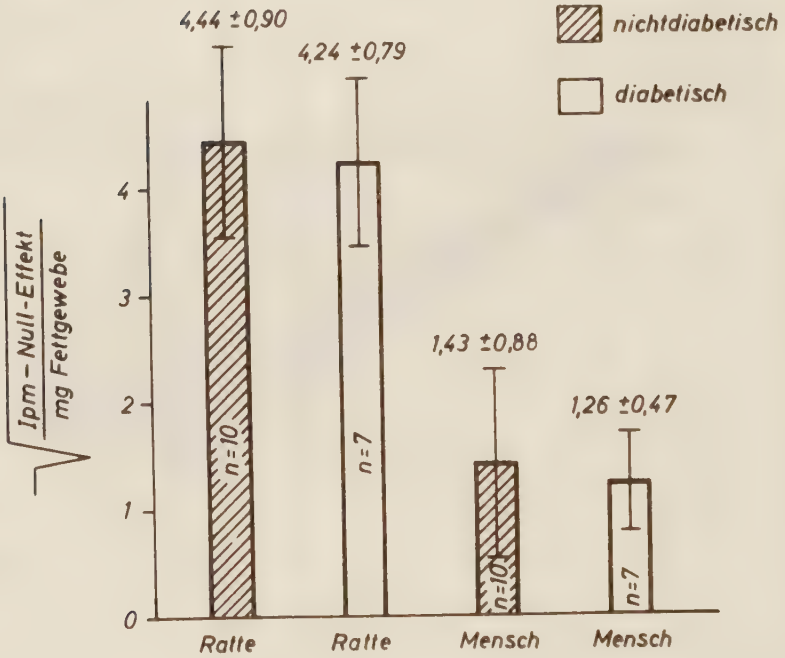

Abbildung 6

Der Einfluss von Butylbiguanid auf die Änderungen der $^{14}CO_2$-Bildung aus $^{14}C_1$-Glucose am Fettgewebe von diabetischen und nichtdiabetischen Menschen und Ratten (typische Einzelbeispiele).

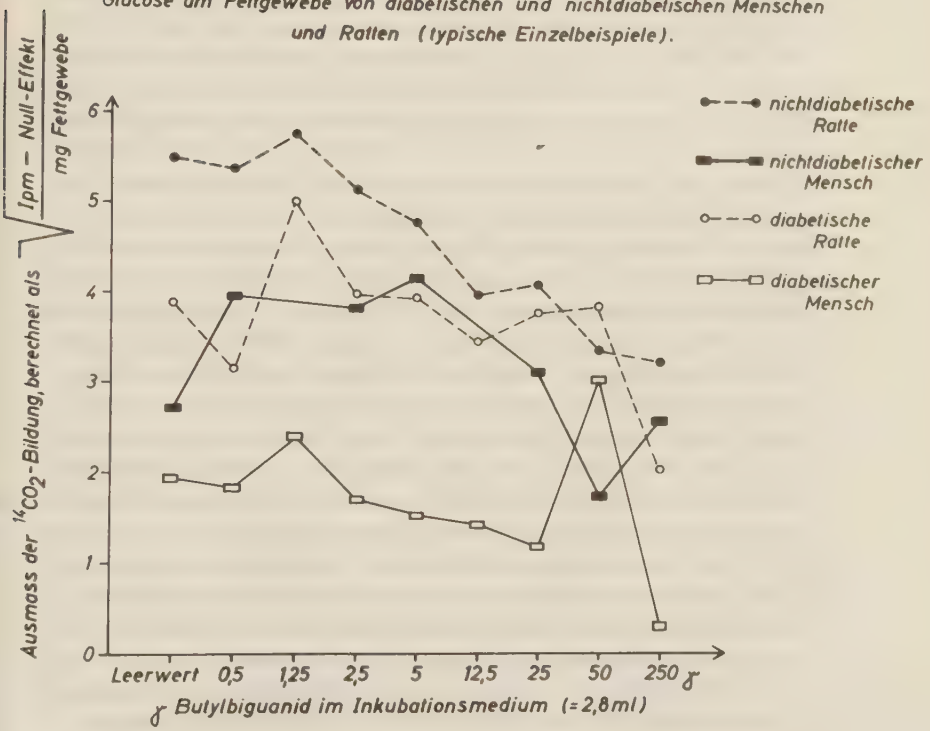

Abbildung 7

IV. Diskussion.

Wie aus der Abbildung 1, die über alle Einzelwerte der biguanidabhängigen $^{14}CO_2$ - Bildung Auskunft gibt, zu ersehen ist, konnten auch wir die deutlich geringere Stoffwechselaktivität des menschlichen Fettgewebes im Vergleich zu den Werten am Nebenhodenfettgewebe der Ratte feststellen. Die Symbole für die am Menschenfettgewebe gewonnenen Meßwerte finden sich fast durchweg in einem Bereich, der erheblich unter demjenigen liegt, in welchem die am Rattenfettgewebe gemessenen Werte liegen. Aus Abb. 1 ist ferner zu ersehen, daß die $^{14}CO_2$ - Bildung aus Glucose in den Bereichen mit hohen Biguanidkonzentrationen abnimmt, wie dies auch von anderen Autoren beobachtet worden ist (5, 6). Die Abb. 1 vermag keinen Aufschluß darüber zu geben, welche Änderungen innerhalb einer Versuchsreihe auftreten, d.h. bei welchen Biguanidkonzentrationen sich das Ausmaß der Glucoseoxydation ändert. Zur Beantwortung dieser Frage war zunächst festzustellen, ob überhaupt Meßwerte über dem Leerwert und außerhalb seines doppelten mittleren Fehlers zu verzeichnen sind. Ferner war zu klären, in welchem Bereich hoher oder niedriger Biguanidkonzentrationen die über dem Leerwert liegenden Meßwerte fallen. Schließlich war von Interesse, in welchem Bereich die maximalen und die minimalen Werte einer Versuchsreihe liegen. Diese können bis zu einem gewissen Grad darüber Auskunft geben, welche Biguanidkonzentrationen im Einzelfall die Glucoseoxydation am meisten fördern oder hemmen.

Es zeigt sich, daß zumeist in Bereichen mit niedrigen Biguanidkonzentrationen viele Meßwerte signifikant erhöht sind, d.h. oberhalb des doppelten mittleren Fehlers des Leerwertes liegen (Tab. I, II, IX, Abb. 2). Damit wird die Ansicht von Schäfer und Mehnert, sowie von Tranquada und Beigelman, daß Biguanide in niedrigen, den therapeutischen Dosen entsprechenden Konzentrationen, einen völligen anderen Effekt entfalten, als wenn sie in hohen Konzentrationen angewendet werden, bestätigt. Werte oberhalb des doppelten mittleren Fehlers des Leerwertes finden sich bei Verwendung von nichtdiabetischem Rattenfettgewebe bei 4 von 10 Versuchsreihen, bei diabetischem Rattenfettgewebe bei 3 von 7 Ver-

suchsreihen. Bei nichtdiabetischem Menschenfettgewebe wurde dieses Verhalten für 5 von 10 Versuchsreihen bzw. bei diabetischem Menschenfettgewebe bei 5 von 7 Versuchsreihen bestätigt (s.Tab. IX). Daß es nicht möglich war, mit den Biguaniden noch häufiger den Effekt der Glucoseoxydation signifikant darzulegen, dürfte mit der unterschiedlichen Ansprechbarkeit des Fettgewebes auf die Biguanidkonzentrationen zusammenhängen. Man muß sich ja vor Augen halten, daß die hier gewählten Konzentrationen als willkürlich ausgesucht anzusehen sind und daß durchaus Konzentrationen, die von uns nicht berücksichtigt wurden, die Glucoseoxydation bevorzugt stimuliert hätten.

Auch für die verschiedenen Arten von Fettgewebe läßt sich, wie aus Abb. 3 u. 4 und Tabelle III ersichtlich ist, eine gewisse Abstufung vornehmen. Es zeigt sich nämlich, daß zur Stimulierung der Glucoseoxydation umso niedrigere Biguanidkonzentrationen benötigt werden, desto stoffwechselaktiver und insulinhaltiger das Fettgewebe ist. Hierbei wird unterstellt, daß Fettgewebe von diabetischen Individuen weniger Insulin enthält, was sich allerdings auf Grund unserer Untersuchungen nicht statistisch sichern ließ. Abb. 6 zeigt, daß nur zwischen der Stoffwechselaktivität von Ratten- und Menschenfettgewebe - gleichgültig, ob ein Diabetes vorlag oder nicht - ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der basalen Glucoseoxydation bestand. Die kleinen Unterschiede innerhalb der Spezies zu Ungunsten des diabetischen Fettgewebes entsprechen zwar den Erwartungen, sind aber nicht signifikant. Die Durchschnittszahlen betragen für alle Fettgewebsleerwerte des nichtdiabetischen und diabetischen Menschen, der nichtdiabetischen und diabetischen Ratte:

$$1{,}430 \text{ und } 1{,}256 \text{ bzw. } 4{,}435 \text{ und } 4{,}241 \quad \sqrt{\text{Ipm-Nulleffekt/mg Fettgew.}}$$

Das Schwergewicht ist also danach auf den Unterschied zwischen Fettgewebe der Ratte und Fettgewebe des Menschen zu legen und weniger darauf, ob es sich um diabetisches oder nichtdiabetisches Fettgewebe handelt. Die Feststellung der relativ geringen Unterschiede zwischen diabetischem und nichtdiabetischem Fettgewebe ist an sich nicht verwunderlich. Weder für die alloxandiabetischen Ratten kann nämlich - auch bei hohen Blutzuckerwerten - eine

starke Verarmung des Fettgewebes an Insulin als bewiesen gelten, und noch viel weniger kann man dies für das Fettgewebe der operierten Patienten annehmen, bei denen selbstverständlich eine gewisse Normalisierung der Stoffwechsellage - zum Teil durch Zufuhr exogenen Insulins - angestrebt wurde.

Trotz dieser Einschränkungen läßt sich, wie oben erwähnt, aus der Tabelle IIIund Abbildung 3, die die Ergebnisse bei Zusatz verschiedener Biguanidkonzentrationen berücksichtigen, eine gewisse Abhängigkeit vom Vorliegen eines Diabetes erkennen. Aus der Tabelle III ist zu ersehen, daß sich die Maxima der Glucoseoxydation unter Biguanideinfluß bei nichtdiabetischen Ratten in 4/5, bei diabetischen Ratten und nichtdiabetischen Menschen in ca. 2/3 und bei diabetischen Menschen in weniger als 1/3 der Fälle in Bereichen mit niedrigen Biguanidkonzentrationen finden. Dieses Verhalten wurde in Abb. 3 graphisch dargestellt. In Abb. 7 sind typische Einzelbeispiele angegeben, die das geschilderte Verhalten noch einmal demonstrieren.

Wenn das Fettgewebe von diabetischen Individuen entnommen wurde, dann wurden also höhere Biguanidkonzentrationen benötigt als bei nichtdiabetischem Fettgewebe, um das größte Ausmaß der Glucoseoxydation zu erreichen. Man muß bedenken, daß es sich bei dem isolierten Fettgewebe auch von nichtdiabetischen Menschen jedoch nicht um ein Gewebe mit normalem Insulingehalt gemäß den an das Gewebe gestellten Anforderungen handeln kann. Es ist zu erwägen, daß dieses Fettgewebe in ein stark glucosehaltiges Inkubationsmedium (178,5 mg %) gebracht wird und mit seinem unverändert bleibenden Insulingehalt nun diese Glucose oxydieren soll. Ein "Nachschub" an Insulin, wie er normalerweise in vivo bei Erreichen solcher Blutzuckerwerte stattfindet, ist bei dieser Versuchsanordnung nicht möglich. Diese Betrachtungsweise ist wichtig, wenn man versucht, die Ergebnisse auf klinische Erfahrungen zu übertragen. Es ist bekannt, daß Biguanide bei normoglykämischen Personen in therapeutischer Dosierung den Blutzucker nicht senken, hingegen bei Diabetikern, also beim Vorliegen einer Hyperglykämie, einen Blutzuckerabfall bewirken. Bei schwereren Diabetesfällen, d.h. bei größerem Insulinmangel werden zur Blutzuckersenkung etwas höhere Biguanid-Dosen benötigt, was mit unseren Befunden über-

einstimmt; denn auch wir sahen (s. Abbildungen 2, 3, 4, 5, 7) bei Zunahme des relativen Insulinmangels bzw. besonders bei Herabsetzung der Stoffwechselaktivität des Fettgewebes, daß etwas höhere Biguanid-Dosen zur optimalen Glucoseoxydation erforderlich sind. Es ist recht aufschlußreich, daß 4 von 5 diabetischen Patienten, deren Fettgewebe bei Biguanidzusatz eine signifikante Steigerung der Glucoseoxydation zeigte, gemäß dem Schweregrad ihres Diabetes in der von uns als charakteristisch dargestellten Verhaltensweise reagierten: ein Patient, der infolge eines leichten Diabetes für die Operation nicht auf Insulin eingestellt zu werden brauchte und deswegen mit Sicherheit über erhebliche körpereigene Insulinreserven verfügte (Fall Nr. 13), zeigte das Maximum der Glucoseoxydation seines Fettgewebes in dem niedrigen Biguanidbereich.

Drei andere, durchweg schwere Diabetesfälle hingegen, die bei zum Teil außerordentlich hohen Blutzuckerwerten vor und nach der Operation mehrfacher Fremdinsulin-Injektionen täglich bedurften, ließen die Maxima der Glucoseoxydation des Fettgewebes ausschließlich in den Bereichen mit höheren Biguanidkonzentrationen erkennen.

Lediglich das Fettgewebe eines Patienten, dessen Diabetes auf Grund seiner Blutzuckerwerte und seines Insulinbedarfes als schwer zu bezeichnen war, zeigt das Maximum der Glucoseoxydation in dem Bereich niedriger Biguanidkonzentrationen.

Die klinische Beobachtung, daß besonders instabile, d.h. zur Hypoglykämie neigende Patienten in ihrer Stoffwechsellage durch Biguanidgaben "stabilisiert" werden können und seltener zu Unterzuckerreaktionen neigen (14), könnte in Übereinstimmung gebracht werden mit unseren bei Fall 1 - 5 (siehe Kasuistik) gewonnenen Ergebnissen. Hier zeigte sich, daß bei Zusatz einer relativ großen Insulinmenge zum Inkubationsmedium die Biguanide die Glucoseoxydation gegenüber dem Leerwert bei jeder Konzentration hemmen. Dies stimmt überein mit den von Ditschuneit und Mitarbeitern (5) am Rattennebenhodenfettgewebe bei Zusatz von Insulin und Biguanid gewonnenen Ergebnissen, wobei sich stets eine Beeinträchtigung der Glucoseoxydation ergab. In gewissem Sinne könnte man

diese Beobachtungen so deuten, daß die Biguanide nur dann über eine Steigerung der Glucoseoxydation blutzuckersenkend wirken, wenn ein solcher Effekt physiologischerweise erforderlich ist und daß umgekehrt bei Überschuß von Insulin eine unmäßig hohe Glucoseoxydation gebremst wird. Wenn man die Werte betrachtet, bei denen es zu einer Hemmung der Glucoseoxydation gekommen ist (siehe Tabelle II, Abb. 1, 5), dann läßt sich feststellen, daß diese Resultate fast durchweg bei Verwendung von sehr hohen Biguanidkonzentrationen erhoben wurden. Wick und Mitarbeiter und Ditschuneit und Mitarbeiter glaubten ja dadurch am Fettgewebe den von Williams postulierten Effekt der Hemmung der Glucoseoxydation durch Biguanide bestätigen zu können. Man kann diesen Autoren zweiffellos folgen, wenn jene hohen Konzentrationen allein zur Debatte stehen. Es muß jedoch berücksichtigt werden, daß diese Biguanidkonzentrationen weit über der therapeutischen Dosis liegen, die nach Messung von Tranquada weniger als 5 γ/ml Blut ausmachen. Damit bewegen sich die blutzuckersenkenden Dosen aber gerade in jener Größenordnung, mit der wir im Modellversuch am Fettgewebe am häufigsten Steigerungen der Glucoseoxydation beobachten konnten. Interessanterweise finden diese Ergebnisse auch in den Resultaten der Glucoseaufnahme des Fettgewebes eine Bestätigung, die jedoch wie schon von Weinges (15) festgestellt wurde, wesentlich gröbere Resultate liefert und einen geringeren Aussagewert besitzt als die $^{14}CO_2$ - Bildung. So ist aus der Tabelle VII zu ersehen, daß sich die Mehrzahl der Maxima der Glucoseaufnahme bei niedrigen Biguanidkonzentrationen findet, während die Minima (Tab. VIII) dementsprechend in Bereichen mit höheren Biguanidkonzentrationen lokalisiert sind. Für das Fettgewebe konnten wir also zwar die Hemmung der Glucoseoxydation in höheren Bereichen, jedoch nicht eine gleichzeitig verstärkte Glucoseaufnahme mit vermehrter Lactatbildung - beides als Ausdruck einer gesteigerten anaeroben Glykolyse - feststellen. Bei den Werten der Milchsäurebestimmung, die lediglich in der Kasuistik wiedergegeben worden sind, läßt sich überhaupt keine Gesetzmäßigkeit feststellen, sodaß die Be-

deutung der Lactatmessung in solchen Fällen recht zweifelhaft erscheint.

Auf Grund der bei unseren Untersuchungen erhaltenen Befunde hat es den Anschein, daß, entsprechend den ersten Vermutungen von Schäfer und Mehnert sowie von Tranquada und Beigelman (7, 8, 9, 10) die Biguanide einen doppelten Wirkungsmechanismus haben. Am Fettgewebe wird die Glucoseoxydation bei hohen Biguanid - Dosen gehemmt, bei niedrigen Biguanid - Dosen jedoch häufig gefördert.

Die spezifische Stoffwechselaktivität des Fettgewebes der einzelnen Spezies, sowie - in einem geringeren Ausmaß - das Vorliegen eines Diabetes, scheinen dabei eine modifizierende Rolle zu spielen. Wie oben ausführlich dargelegt, fügt sich diese Betrachtungsweise über den Wirkungsmechanismus der Biguanide wesentlich besser in das Bild der bisherigen klinischen experimentellen Beobachtungen, als es bei anderen Theorien über die Wirkungsweise der Biguanide der Fall war. Nach unserer Ansicht wirken die Biguanide bei diabetischen Menschen blutzuckersenkend über eine direkte oder indirekte Steigerung der Glucoseoxydation, die ohne gleichzeitig vorhandenes endogenes oder exogenes Insulin (16) nicht zustande kommen kann. Die bei überhoher Dosierung im Experiment beobachtete Hemmung der Glucoseoxydation besitzt kein klinisches Korrelat und ist nur von theoretischem Interesse. Gegen die Übertragbarkeit der Befunde der Hemmung der Glucoseoxydation auf klinische Verhältnisse sprechen außer den bereits genannten Gründen Untersuchungsbefunde, die weder einen Anstieg der freien Fettsäuren im Serum (17), noch eine vermehrte Ausscheidung von Lactat im Harn biguanidbehandelter Patienten erweisen konnten (18).

Wenn auch der Wirkungsmechanismus der Biguanide in seinen Einzelheiten noch nicht geklärt ist, so sollten unsere Untersuchungen doch wenigstens dazu beitragen, das Augenmerk auf experimentelle Ergebnisse zu lenken, die bei Verwendung niedriger, d.h. den therapeutischen Dosen entsprechender Biguanidkonzentrationen erhoben wurden und mit den Erfahrungen der Klinik in guter Übereinstimmung stehen.

V.Zusammenfassung.

Als Beitrag zum Wirkungsmechanismus der blutzuckersenkenden Biguanide wurde der Einfluss von Butylbiguanid auf die Glucoseoxydation des menschlichen Fettgewebes geprüft.Zu diesem Zweck wurde Butylbiguanid in verschiedenen Konzentrationen in 10 Versuchsreihen mit nichtdiabetischem und in 7 Versuchsreihen mit diabetischem Fettgewebe inkubiert.Dabei zeigte sich, dass Biguanide besonders in niedrigen Konzentrationen die Glucoseoxydation signifikant zu stimulieren vermögen,während - wie auch andere Autoren mitteilten - die Glucoseoxydation bei Verwendung von hohen Konzentrationen gehemmt wird.Der Effekt der Stimulierung der Glucoseoxydation ist an Fettgewebe mit niedriger Stoffwechselaktivität durchschnittlich bei etwas höheren Biguanidkonzentrationen feststellbar.Demzufolge werden für Versuche am Menschenfett höhere Konzentrationen benötigt als für Untersuchungen am besonders stoffwechselaktiven Nebenhodenfettgewebe der Ratte.Mit Einschränkung gilt dies auch für den Unterschied des Fettgewebes,das nichtdiabetischen und diabetischen Individuen entnommen wurde.Das Fettgewebe der Letzteren ist dabei als das weniger stoffwechselaktive anzusehen.Die gleichzeitig erhobenen Befunde der Glucoseaufnahme und der Lactatbildung im Inkubationsmedium bringen darüber hinaus keine neuen Gesichtspunkte.
Unsere Untersuchungsergebnisse sind insofern mit klinischen Erfahrungen vergleichbar,als Biguanide nur bei einem gewissen Mangel,nicht hingegen bei einem Überschuss an Insulin die Glucoseoxydation stimulieren.Das vorliegende Schrifttum wurde diskutiert.

VI.Literaturverzeichnis.

(1) Martin,D.B.,A.E.Renold und Y.M.Dagenais:Lancet 1958 II,76.
(2) Wörner,H.und K.F.Weinges:Klinische Wochenschrift 39:243 (1961).
(3) Correa,P.Riet und A.Magalhaes:Metabolism 10:808(1961).
(4) Mirsky,A.:Biochimica et Biophysica Acta 50:603(1961).
(5) Ditschuneit,H.,E.F.Pfeiffer und H.G.Rossenbeck:Klinische Wochenschrift 39:71(1961).
(6) Wick,A.N.,E.R.und G.S.Serif:The Journal of Biological Chemistry 233:296(1958).
(7) Schäfer,G.:Diskussionsbemerkung zu (8).
(8) Mehnert,H.:Blutzuckersenkende Biguanid-Derivate in der Diabetestherapie.Hauptreferat,IV.Internationaler Diabetes-Kongress,Genf,1o.-14.Juli 1961.
(9) Tranquada,R.und Beigelman P.M.:Clinical Research 8:248 (1960).
(10) Tranquada,R.:Coreferat zu (8),IV.Internationaler Diabetes-Kongress,Genf,1961.
(11) Jüttner,D.:Inaug.-Dissert.1962(imDruck).
(12) Mirsky,A.:Diskussionsbemerkung,IV.Internationaler Diabetes-Kongress,Genf,1961.
(13) Mirsky,A.:Vortrag,Jordanas Medicas del Hospital Colonia 17.-19.Sept.1961,XXV.Anniversario.
(14) Mehnert,H.undL.P.Krall:Deutsche medizinische Wochenschrift 85:577(1961).
(15) Weinges,K.F.und H.Wörner:Klinische Wochenschrift 39:238 (1961).
(16) Creutzfeldt,W.,U.Deuticke u.H.-D.Söling:Klinische Wochenschrift 39:790(1961).
(17) Mehnert,H.,L.Pelikan und N.Zöllner:Klinische Wochenschrift 39:888(1961).
(18) Willner,I.:Inaug.-Dissert.1962(imDruck).

Herrn Prof.Dr.W.Seitz danke ich für die Überlassung des Themas.Zu grossem Dank bin ich Herrn Dr.H.Mehnert für sein stetes Entgegenkommen und für seine unermüdliche Hilfe verpflichtet.Ebenso sei hier Herrn Dr.G.Schäfer für seine Bemühungen besonders gedankt.

VII. Lebenslauf

Am 17.9.1929 wurde ich, Rudolf Weigl, als Sohn des Uhrmachers Ludwig Kronwinkler und Rosa Bender, geb. Weigl in München geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Neuötting/Inn von 1936 bis 1940 war ich Schüler des Humanistischen Gymnasiums in Burghausen. Im Juli 1949 bestand ich dort das Abitur. Anschließend folgte eine 2-jährige Lehrzeit in einem chemischen Laboratorium der Firma Anorgana Gendorf (jetzt Farbwerke Hoechst), die 1951 mit der Laborantenprüfung beendet wurde. Im Wintersemester 1953/54 schrieb ich mich an der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität München zum Chemiestudium ein. Seit dem Wintersemester 1957/58 studiere ich dort Medizin. Im Sommersemester 1959 bestand ich in München das Physikum. Am 12.12.1962 bestand ich das medizinische Staatsexamen in München.